

Г. Ф. МАКСИМОВА, В. А. БАБИЧЕВ, Б. С. УТЕШЕВ

АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЕЛЕЗЕНКИ НА РАННЕМ ЭТАПЕ ПЕРВИЧНОГО ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 13 IV 1972)

Исследованиями последних лет показано, что иммунологический ответ на различные антигены начинается с пролиферации очень небольшого числа антигенчувствительных клеток. По приблизительным оценкам Кеннеди и его сотрудников (¹¹), использовавших систему переноса, в селезенке интактных мышей содержится около 1000 клеток, реагирующих на эритроциты барана. В экспериментах Гроувса и сотрудников (¹) с помощью диффузионных камер получена аналогичная величина.

В течение пролиферативной фазы первичного иммунологического ответа клеточная масса селезенки мышей увеличивается приблизительно на одну треть по сравнению с исходным состоянием (^{12, 10}). Предполагается, что это увеличение обеспечивается за счет пролиферации лимфоидных клеток, стимулированных к делению антигеном. Однако к концу индуктивной фазы ответа на эритроциты барана число антителообразующих клеток в селезенке составляет всего 1–1,5% от общего клеточного прироста. Из этого следует, что процессы, происходящие в лимфоидной ткани селезенки, отвечающей на антиген, не ограничиваются делением и дифференцировкой одних лишь коммиттированных клеток-предшественников. Как показано Байфилдом и Серкарцем (³), уже через сутки после введения антигена начинается также пролиферация клеток, формирующих иммунологическую память. Кроме того, биохимическими и иммунохимическими методами установлено, что в это же время интенсивно делятся и клетки, синтезирующие неспецифические иммуноглобулины (^{1, 14}).

Однако на количество клеток в селезенке может влиять и такой фактор, как миграция лимфоцитов в нее и из нее (¹⁰). Но, к сожалению, информация этого рода в доступной нам литературе отсутствует. Кинетические исследования процессов деления в иммунной селезенке с помощью H^3 -тимидина проводятся главным образом на моделях, использующих клеточные популяции, изолированные либо в течение всего иммунологического ответа (^{15, 4, 16}), либо в момент включения метки (²). При изучении же лимфоидной ткани селезенки, мечение которой осуществлялось в условиях *in vivo* (^{8, 9}), исследователи обычно ограничиваются наблюдением таких структурных единиц органа, как герминальные центры. В этой связи представлялось интересным сравнить поведение меченых лимфоидных клеток в селезенке иммунизированных и интактных животных после импульсной метки H^3 -тимидином. Для этого мы избрали вторые сутки первичного иммунологического ответа, которая характеризуется резким повышением инкорпорации тритированного тимидина в клетки селезенки (²).

В работе использовали мышей линии СВА весом 18–22 г. Животные получали по 0,5 мл 5% эритроцитов барана. Через 38 час. после иммунизации мышам вводили внутривенно H^3 -тимидин в дозе 20 μ C на мышь

(специфическая активность 290 мС/ммоль). В первой подгруппе животных забивали через 1 час, во второй — через 10 час. после введения метки (соответственно через 39 и 48 час. после антигенного стимула). В каждой подгруппе контрольными животными служили интактные мыши, получившие H^3 -тимидин за 1 или 10 час. до забоя, соответственно. Мазки, приготовленные из клеточной суспензии селезенки, экспонировали с эмульсией в течение 8 недель, после чего их окрашивали по Романовскому.

Через 1 час после импульсной метки общий индекс мечения в селезенке неиммунизированных мышей был равен 4% (рис. 1). Если забой животных проводили через 10 час. после введения H^3 -тимидина, то индекс мечения возрастал более чем в 2 раза. Индексы мечения в лимфоидном аппарате селезенки после однократного введения H^3 -тимидина иммунизированным мышам в 2 раза выше соответствующих показателей у интактных животных. Это согласуется с автордиографическими и радиометрическими данными для первичного (¹², ¹⁰) и вторичного (¹⁵, ¹²) иммунологических ответов.

Между тем как в опыте, так и в контроле за 10 час. после введения H^3 -тимидина общий индекс мечения увеличился приблизительно в 2 раза. Следовательно, если говорить об относительном приросте меченых клеток в селезенке со временем после импульсной метки, то процент мечения лимфоидной популяции в целом не выявляет различий между иммунной и интактной селезенкой.

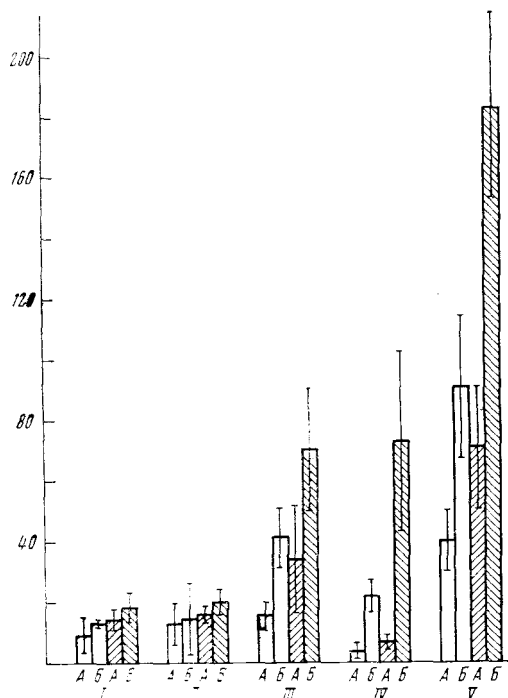
Однако анализ индексов мечения внутри названных выше классов позволил обнаружить существенные кинетические сдвиги, характерные для данного периода иммунологического ответа. Как и ожидалось, в классе blastov и больших лимфоцитов меченые клетки встречались чрезвычайно часто: до 80 и 60% (соответственно) как через 1, так и через 10 час. после мечения. Существенных различий между опытом и контролем выявить не удалось. Средние и особенно малые лимфоциты через 1 час после инъекции тритированного предшественника как в опыте, так и в контроле включали H^3 -тимидин чрезвычайно редко, но все же у иммунизированных животных в 2 раза чаще, чем у интактных (1% и 0,5% соответственно). Через 10 час. после введения метки индекс мечения малых лимфоцитов в стимулированной селезенке увеличился до 12,2%, т. е. в 12 раз, а в интактной всего лишь до 3,6%, т. е. в 7 раз. В классе средних лимфоцитов процент мечения за 10 час. наблюдения увеличился в опыте в 1,5 раза, а в контроле в 2 раза. Таким образом, относительный прирост меченых клеток в селезенке иммунизированных животных значительно выше в классе малых лимфоцитов и ниже в классе средних лимфоцитов по сравнению с интактными животными. Следовательно, наиболее чувствительными к антигенному стимулу на данной стадии иммунологического ответа оказались малые лимфоциты.

Накопление меченых клеток в классах средних и малых лимфоцитов, составляющих 80–90% клеточной массы лимфоидной ткани селезенки, полностью обеспечивает нарастание индексов мечения в опыте и контроле, не нарушая нормальных соотношений между классами. Поэтому изменение частоты меченых лимфоцитов каждого класса, выраженной в промилле, фактически повторяет изменение индекса мечения внутри каждой субпопуляции. Так, наибольшие сдвиги отмечены в субпопуляциях средних и малых лимфоцитов (рис. 1).

Таким образом, у иммунизированных мышей относительный прирост меченых малых лимфоцитов происходит быстрее, чем в контроле. Поэтому, если через 1 час после введения H^3 -тимидина меченые малые лимфоциты в иммунной селезенке в 2 раза превышают количество малых лимфоцитов в нормальном органе (в расчете на 1000 клеток), то через 10 час. разница этих показателей увеличивается до 3,4 раза. В результате этого доля малых лимфоцитов в меченой популяции лимфоидных клеток селезенки (табл. 1) возрастает в опыте в 4 раза (с 10 до 40%), а в контроле лишь в

2,5 раза (с 10 до 25%). Таким образом, поведение меченых лимфоцитов в селезенке иммунизированных мышей свидетельствует о гетерогенности лимфоидной ткани селезенки в отношении индуктивного влияния антигена. Так, в интервале от 38 до 48 час. после первичной антигенной стимуляции наиболее чувствительными к антигену являются клетки типа средних и, особенно, малых лимфоцитов. Возможно, что активированные к де-

Рис. 1. Результаты анализа включения H^3 -тимидина в лимфоидные клетки селезенки мышей (количество меченых клеток в % от всех сосчитанных лимфоидных клеток). I — blast, II — большие лимфоциты, III — средние лимфоциты, IV — малые лимфоциты, V — суммарно для всех классов, включая плазматические клетки. Незаштрихованные столбики — мыши, получившие только H^3 -тимидин (контроль), заштрихованные — получившие H^3 -тимидин через 38 час. после введения эритроцитов барана. А, Б — животные, забитые через 1 час и через 10 час. после введения H^3 -тимидина соответственно



лению клетки соответствуют пиронинофильным лимфоцитоподобным клеткам⁽³⁾, которые первыми отвечают на антиген усилением включения H^3 -тимидина.

В порме лимфоидная ткань селезенки характеризуется стационарным состоянием⁽⁶⁾. Поэтому удвоение индекса мечения в течение 10 час. и одновременное снижение средней интенсивности мечения до половины первоначальной величины, полученное нами у контрольных животных, свидетельствует о том, что меченые клетки за 10 час. наблюдения успели разделиться. Полученные результаты хорошо согласуются с данными Флиднера и соавторов⁽⁶⁾. Эти исследования показали, что меченые лимфоциты нормальной селезенки делятся в течение первых 12 час. после однократного введения H^3 -тимидина. Под влиянием антигена лимфоидная популяция селезенки выходит из состояния динамического равновесия и превращается в растущую популяцию^(12, 10). Если бы этот процесс осуществлялся только за счет деления лимфоцитов, находящихся в момент введения H^3 -тимидина в селезенке, то увеличение индекса мечения сопровождалось бы разведением метки. Так, повышение индекса мечения в 2,5 раза в эксперименте должно было бы дать снижение средней интенсивности мечения на ядро приблизительно вдвое. Однако в опыте, в отличие от контроля, мы получили лишь незначительное уменьшение данного показателя: с 35,8 до 32,6 зерен на клетку. В пересчете на 1000 лимфоцитов это дало 2556 и 5852 зерна соответственно, т. е. увеличение индекса мечения сопровождалось нарастанием общей радиоактивности в селезенке, что, по-видимому, обусловлено поступлением в орган меченых клеток, находившихся вне его в момент введения метки.

Включение Н³-тимидина в лимфоидные клетки селезенки мышей (в процентах)

Интервал между введением Н ³ -тимидина и забоем животных	Бласты			Большие лимфоциты			Средние лимфоциты			Малые лимфоциты		
	опыт (а)	конт-роль (б)	а/б	опыт (а)	конт-роль (б)	а/б	опыт (а)	конт-роль (б)	а/б	опыт (а)	конт-роль (б)	а/б

Мечение внутри классов

А. 1 час	84,6	72,9	1,2	62,9	44,4	1,4	14,1	5,9	2,4	1,0	0,5	2,0
Б. 10 час.	74,5	74,6	1,0	63,2	57,0	1,1	21,7	11,9	1,8	12,2	3,6	3,4
Б: А	0,9	1,0	—	1,0	1,3	—	1,5	2,0	—	12,2	7,2	—

Структура меченой популяции

А. 1 час	20,8	21,6	1,0	22,1	30,5	0,7	47,3	38,4	1,2	9,8	9,5	1,0
Б. 10 час.	10,2	14,4	0,7	11,2	15,8	0,7	38,4	45,1	0,9	40,2	24,7	1,6
Б: А	0,5	0,7	—	0,5	0,5	—	0,8	1,2	—	4,1	2,5	—

Примечание. Опыт — животные, получившие Н³-тимидин через 38 час. после введения эритроцитов барана; контроль — животные, получившие только Н³-тимидин.

Таким образом, накопление меченых лимфоцитов в селезенке происходит не только за счет активации процессов деления в самой селезенке, но, очевидно, и за счет притока в нее активированных к делению клеток. Следовательно, прирост клеточной массы селезенки в течение пролиферативной фазы первичного иммунологического ответа в определенной степени обеспечивается и миграцией лимфоидных клеток в этот орган. Вероятно, пребывающая в селезенку популяция состоит главным образом из клеточных элементов типа малых и средних лимфоцитов и, возможно, обладает большими пролиферативными потенциями, чем селезеночные клетки. Что касается источника клеток, мигрирующих в селезенку, то решение этого вопроса выходит за рамки данного исследования. Можно только предположить, что на раннем этапе первичного иммунологического ответа у мышей в их селезенку поступают клетки из тимуса, для которого, как известно, характерна очень высокая клеточная продукция и клеточная потеря⁽¹³⁾. В пользу этого предположения говорит и тот факт, что в системе переноса тимоциты первыми отвечают на антиген волной митозов, опережая клетки костно-мозгового происхождения⁽⁵⁾. Однако это не исключает участия последних в миграционных процессах, стимулированных антигеном.

Второй Московский государственный
медицинский институт
им. Н. И. Пирогова

Поступило
6 IV 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Е. Гурвич, Г. И. Дризлих, Молек. биол., **1**, 2, 279 (1967). ² В. Н. Гусев, Биосинтез нуклеиновых кислот, белка и антител в норме и при первичном иммунном ответе (цитохимическое исследование), Автореф. кандидатской диссертации. М., 1969. ³ P. Byfield, E. Sercarz, J. Exp. Med., **129**, 5, 897 (1969). ⁴ E. E. Capralbo, T. Makinodan, J. Immunol., **92**, 2, 234 (1964). ⁵ A. J. S. Davies, E. Leachars et al., Transplantation, **5**, 2, 222 (1967). ⁶ T. M. Flidner, M. Kesse et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., **113**, 2, 578 (1964). ⁷ D. L. Groves, W. E. Lever, T. Makinodan, J. Immunol., **104**, 1, 148 (1970). ⁸ M. G. Hanna, Intern. Arch. Allergy, **26**, 4, 230 (1965). ⁹ M. G. Hanna, D. Swartzendruber, C. C. Congdon, Germinal Centers in Immune Responses, Berlin — Heidelberg — N. Y., 1967, p. 189. ¹⁰ G. Harris, S. R. Pele, Immunol., **19**, 6, 865 (1970). ¹¹ J. C. Kennedy, L. Siminovitch et al., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **120**, 3, 868 (1965). ¹² T. Makinodan, T. Sado et al., Curr. Topics Microbiol. and Immunol., **49**, 80 (1969). ¹³ W. D. Michalke, M. W. Hess et al., Blood, **33**, 4, 541 (1969). ¹⁴ G. Urbain-Vansanten, Immunol., **19**, 5, 783 (1970). ¹⁵ P. Urso, T. Makinodan, J. Immunol., **90**, 6, 897 (1963). ¹⁶ J. D. Wakefield, G. J. Thorbecke, J. Exp. Med., **128**, 1, 153 (1968). ¹⁷ H. P. Wagner, H. Cottier et al., Exp. Cell. Res., **46**, 441 (1967).